

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-007576
(43)Date of publication of application : 14.01.1991

(51)Int.Cl.

C12M 3/04
C12N 5/00
G01N 27/327
G03F 7/26
H01L 21/027
H01L 49/00

(21)Application number : 01-141964

(71)Applicant : KANEKA FUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 03.06.1989

(72)Inventor : MATSUDA TAKEHISA

INOUE KAZUHIKO
TANI NOBUTAKA

(54) ORIENTATION CONTROLLING TOOL FOR CELL, PRODUCTION THEREOF AND METHOD FOR CONTROLLING ORIENTATION OF CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a fine pattern with a high resolution of μm order by forming an orientation pattern composed of a cell adhesive and a cell nonadhesive surfaces.

CONSTITUTION: A cell nonadhesive hydrophilic polymer, composed of a hydrophilic polymer (e.g. PVA) without any electric charge and a compound (e.g. sodium 4,4'-diazidostilbene-2,2'-disulfonate) and having photosensitivity is applied or adsorbed on the surface in which a polymer having cell adhesion (e.g. polyacrylic acid) is immobilized and then irradiated with light through a photomask having a desired orientation pattern, subsequently washed and developed to form an image of the cell nonadhesive hydrophilic polymer.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 平3-7576

⑫ Int. Cl.	識別記号	序内整理番号	⑬ 公開 平成3年(1991)1月14日
C 12 M 3/04		8717-4B	
C 12 N 5/00		6807-4B	
G 01 N 27/327		7124-2H	
G 03 F 7/26		7733-5F	
H 01 L 21/027		7363-2G G 01 N 27/30 3 5 1	Z
49/00		2104-5F H 01 L 21/30 3 6 1	L
		2104-5F 6807-4B C 12 N 5/00 A	A
		審査請求 未請求 請求項の数 3 (全7頁)	

⑭ 発明の名称 細胞の配列制御用具、その製法および細胞の配列制御法

⑮ 特願 平1-141964
 ⑯ 出願 平1(1989)6月3日

⑰ 発明者 松田 武久 大阪府箕面市栗生外院244-1 B-512
 ⑰ 発明者 井上 和彦 兵庫県神戸市須磨区横尾8丁目1-1 42-504
 ⑰ 発明者 谷 紘孝 大阪府大阪市阿倍野区文の里4丁目17-29
 ⑰ 出願人 鎌淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
 ⑰ 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 外2名

日月 東田 智子

る工程

または

(1) 感光性を有する細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2) (1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3) 洗浄により現像し、細胞接着性親水性高分子よりなる像を細胞非接着性表面に形成させる工程

を経て形成されることを特徴とする細胞の配列制御用具の製法。

3 請求項1記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法。

3 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、細胞の配列制御用具、その製法お

および細胞の配列制御法に関する。

【従来の技術】

近年、細胞工学、LSI技術、医工学などの急激な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、さらにはニューロコンピューターなどが注目を集め、これらの開発が活発に行なわれている。

細胞を望むように配列させ、しかもその機能を維持させておくことは難しく、細胞を用いたデバイス実現の一つの障壁となっている。細胞を望むように配列させて回路網を形成させるというような細胞の配列制御技術は、これらのデバイス実現のための大きなキーテクノロジーとなりうる。

【発明が解決しようとする課題】

細胞の配列を制御する試みとしては、インクジェットプリンターを用いて細胞接着性蛋白質であるフィプロネクチンを塗布してパターンを形成し、この上で細胞を培養させた例があるが、

の配列制御用具、

細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンが、

(1)感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2)(1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3)洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させる工程

または

(1)感光性を有する細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2)(1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3)洗浄により現像し、細胞接着性親水性高分子

解像度がわろく不均一であり、微細加工には適していない。

また、最近、人工的な凹凸面を用いて神経細胞シナプス成長の方向制御を試みた例があるが、望むような配列を形成させるまでには至っていない。

【課題を解決するための手段】

本発明者は、このような実状に鑑み、細胞の配列を容易に制御する方法について継続研究を重ねた結果、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する材料表面上で細胞を培養することにより、細胞の配列が容易に制御できること、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する細胞の配列制御用具が、特定の工程を経て容易に製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は
細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞

よりなる像を細胞非接着性表面に形成させる工程

を経て形成されることを特徴とする細胞の配列制御用具の製法、ならびに

前記細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法に関する。

【実施例】

本発明の細胞の配列制御用具は、パターン化した細胞接着性表面と細胞非接着性表面とが本発明の細胞の配列制御用具となる材料の表面に形成されたものである。

前記細胞接着性表面とは、カルボキシル基やアミノ基などの電荷を有する官能基および(または)RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)のような細胞接着性ペプチドを導入した表面、または細胞接着性を有する高分子を固定した表面をいう。

前記カルボキシル基やアミノ基などの官能基は、本発明の配列制御用具となる材料表面をプラズマなどの放射線で処理することにより導入

することができる。この際の前記材料としてはプラスチック製の培養用皿、フィルム、チューブなどを利用しうる。

前記細胞接着性を有する高分子の具体例としては、たとえばポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミンなどの電荷を有する合成高分子、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デキストラン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの電荷を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィプロネクチン、ハイドロネクチンなどの細胞接着性蛋白質、さらには細胞接着性蛋白質や細胞接着性ペプチドを固定した合成高分子などがあげられるが、これらに限定されるものではない。これらは単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

また、前記細胞非接着性表面とは、接触角が100度以上の疏水性表面、または電荷を有さず接触角が50度以下の親水性表面をいう。

前記疏水性表面の具体例としては、たとえば

る配列パターンを

(1)感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2)(1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3)洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させる工程

を経て形成する方法を説明する。

第1の製法においては、たとえば細胞非接着性親水性高分子、好ましくは前記電荷を持たない親水性高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物とからなる組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞接着性表面に容易に固定される。また、前記高分子に直接アジド基を導入したもの用いることもできるが、アジド基を導入する特別な操作

ポリテトラフルオロエチレン、シリコーンなどから形成された表面があげられるが、これらに限定されるものではない。

また、前記接触角が50度以下の親水性表面の具体例としては、電荷を持たない親水性高分子よりなる表面、たとえばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、さらにはこれらを構成する単量体の共重合体、セルロースなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。

さらに、本発明の細胞の配列制御用具を形成しうる素材としては、たとえば各種プラスチック、ガラス、金属などがあげられ、すでにデバイスとして用いられているたとえば培養用皿、半導体基盤などの材料も利用できる。

つぎに前記細胞の配列制御用具の製法について説明する。

まず第1の製法として、

細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりな

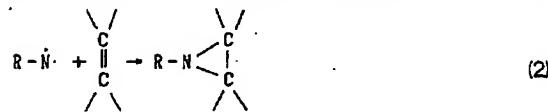
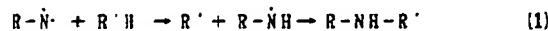
が不要な点および現像時の未反応物の除去が容易な点で、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を用いるのが好ましい。

前記2個以上のアジド基を有する化合物としては、たとえば第1表に示すような一般のビスマスアジド化合物、1分子中に2個以上のアジド基を導入したアジド化ポリマーなどが利用できるが、これらに限定されるものではない。上記アジド基には、たとえばカルボニルアジド($R-CO-N_3$)、スルホニルアジド($R-SO_2-N_3$)、芳香族アジド($R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_3$)などがあるが、安定性のよい芳香族アジドまたはスルホニルアジドが好ましい。また、より長波長域の光でナイトレンに転化できる点で、ニトロ基のような電子吸引性置換基を有する芳香族アジド、1線または2線感光性のビスマスアジド化合物がさらに好ましい。

表

比 叉 了 沙 F 化 合 物	深 色	中 等	浅 色
	deep	UV	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"
	"	"	"

該高分子は、アジド基が光照射により転化したナイトレン基が、細胞接着性表面および該高分子に対して、たとえば次式に示すような化学反応、すなわち、水素引抜き反応(1)、二重結合への付加やC-H結合への挿入(2)、およびカップリング反応(3)を行なうことにより固定される。



なお、ナイトレン基はきわめて反応性が高いため、上記の反応以外の反応による結合が生じるばあいもある。また、上記反応が該高分子間に生じ、架橋が生じるばあいがあるが、これにより該高分子がより安定的に細胞接着性表面に固定されるばあいがある。さらに、該高分子が前述のごとく細胞接着性表面に結合していなくとも、皮膜として付着し固定されていてもよい。

該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を細胞接着性表面に存在させる方法としては、該組成物をメタノールのような揮発性有機溶媒に溶解または懸滴し、この液を細胞接着性表面に、塗布または噴霧したのち乾燥し、該組成物の薄層を細胞接着性表面に形成させる方法、該組成物の水溶液またはコロイド溶液と細胞接着性表面とを接触させ、細胞接着性表面に吸着させる方法などがある。これらのなかでも均質な薄層がえられる点で、揮発性有機溶媒の溶液を用いてキャスト製膜する方法が好ましい。

また、2個以上のアジド基を有する化合物を細胞接着性表面に存在させたのち、その上に該高分子を存在させてもよい。

前記光照射に用いる光源としては、高圧水銀灯、低圧水銀灯、超高圧水銀灯などの各種水銀灯、エキシマレーザーなどがあるが、長波長域で感光可能なアジド化合物を用いるばあいは、フィルターにより短波長域をカットすることに

より、短波長紫外線による該高分子や材料表面への影響を軽減することができる。これは蛋白質などの親水性高分子を用いるばあいとくに好ましい。

また、ナイトレン基の反応は極めて短時間で完了するため、露光時間は5分以内でよい。

パターン露光の方法は、パターンを有するフォトマスクを設置した上より光照射する方法、エキシマレーザーによるリソグラフィーを利用する方法などがある。

一方、細胞の配列制御用具の第2の製法は、前記第1の製法の(1)の工程において、感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着せしむるかわりに、感光性を有する前記細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着せしむるほかは、第1の製法と同様にして製造する方法である。

第2の製法によれば、たとえば前記細胞接着性を有する高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を本発明

の細胞の配列制御用具となる細胞非接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞非接着性表面に容易に固定される。

前記のごとく製造される細胞の配列制御用具を用い、常法により細胞を培養することにより、細胞配列を容易に制御でき、ミクオーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。

えられた微細パターンは、超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピューターなどの開発に有用である。

つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

N,N-ジメチルアクリルアミドモノマー（朝興人製）をアセトン中、過酸化ベンゾイルおよび*N,N*-ジメチル-p-トルイジルレドックス系開

始剤として重合し、ポリ(*N,N*-ジメチルアクリルアミド)（以下、PDMAAという）をえた。

えられたPDMAA 95部（重量部、以下同様）に対して、ビスマジド化合物である4,4'-ジアジドステルベン-2,2'-ジスルホン酸ソーダ5部を混合したものメタノールに溶かし、0.1%（重量%、以下同様）溶液とした。

この溶液を、組織培養用ポリスチレンシャーレ（コーニング（CORNING）社製）上に滴下し、キャスト膜して風乾し、厚さ数十μの膜を形成したのち、この上に第3図に示すような開孔部と非開孔部とからなる一対の幅が250μであるスリットを有するフォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。なお、第3図はフォトマスクの写真のスケッチ図である。

つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PDMAAおよびシャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

このようにしてえたシャーレに、牛血管内皮

細胞を播種し、15%子牛血清（FCS）を含むDMEB（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）を培地として用い、37℃のCO₂インキュベーター内で培養したところ、内皮細胞はPDMAA非固定部（非露光部）のみに選択的に伸展・増殖し、第1図および第2図に示す細胞の配列パターンがえられた。第1図は染色された細胞の配列パターンの写真（倍率は第3図のもとになる写真と同じ）のスケッチ図、第2図は第1図のもとになる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図である。

実施例2

実施例1のばあいと同様にして調製したビスマジド化合物を含むPDMAAの0.1%メタノール溶液を、ポリスチレンシャーレ上に滴下し、キャスト膜して風乾してのち、高圧水銀灯を用いて紫外線を照射し、PDMAAを光固定したシャーレ（以下、PDMAAシャーレといいう）をえた。

N,N-ジメチルアクリルアミド80部とアクリロキシコハク酸イミド（国産化学製）20部よりな

る共重合体とフィブロネクチンとを、リン酸緩衝液 (pH8.5) 中で反応させ、フィブロネクチンを固定したN,N-ジメチルアクリルアミド共重合体（以下、PN-PDMAAという）をえた。

PN-PDMAA 95 部に対してビスアジド化合物 5 部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1 % 溶液とした。

えられた溶液をPDMAA シャーレ上にキャスト 製膜して風乾し、厚さ数十μの膜を形成したのち、フォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて80秒間パターン露光した。

つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PN-PDMAAおよびPDMAA シャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

このようにしてえたシャーレを用いて実施例1のばあいと同様にして、牛血管内皮細胞を培養したところ、内皮細胞は、PN-PDMAA固定部（露光部）のみに選択的に伸展・増殖し、細胞による配列パターンがえられた。

【発明の効果】

もとになる写真と同じ）のスケッチ図である。

本発明の細胞の配列制御用具は、細胞の付着の有無の選択性がよく、これを用いることにより、従来の細胞培養と同様にして培養を行なって容易に精度の高い細胞配列制御をすることができ、極めて微細かつ高解像度の細胞配列パターンを容易に形成することができる。

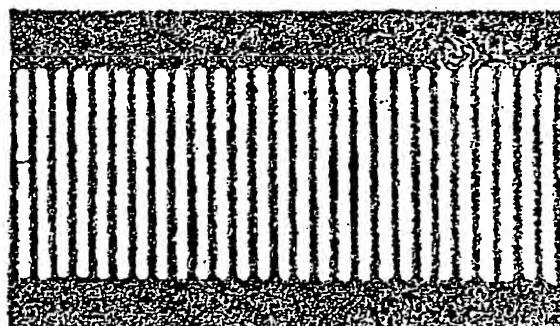
また、本発明の製法により、前記配列制御用具を容易に製造することができる。

本発明は、各種細胞機能を応用した超小型バイオセンサー、スイッチング素子、ハイブリッド型人工臓器、バイオリアクター、ニューロコンピューターなどの開発に大きく貢献するものである。また、細胞間の情報伝達などの細胞機能の研究においても応用できるものである。

4 図面の簡単な説明

第1図は染色された細胞の配列パターンの写真のスケッチ図、第2図は第1図のもととなる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図、第3図はフォトマスクの写真（倍率は第1図の

第 1 図



特許出願人
代理人弁理士

雄瀬化学工業株式会社

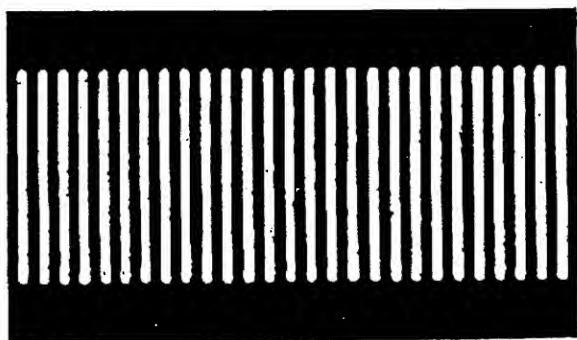
朝日奈宗太ほか2名



第 2 図



第 3 図



手続補正書(自発)

平成1年7月8日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1 事件の表示

平成1年特許願第141964号

2 発明の名称

細胞の配列制御用具、その製法および細胞の配列制御法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪市北区中之島三丁目2番4号

名称 (084) 錦潤化学工業株式会社

代表者 館 純

方 式
審査

○

4 代理人 〒540

住所 大阪市中央区谷町2丁目2番22号

NSビル

氏名 (8522) 井理士 朝 日 奈 宗 太太日理

電話 (06) 943-8922 (代)

印

井理士

ほか2名



5 補正の対象

(1) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6 補正の内容

(1) 明細書17頁2行の「Dulbecco's」を
「Dulbecco's」と補正する。

以上